

А.Э. Эргешов, Л.Н. Черноусова, С.Н. Андреевская

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Российская Федерация

Новые технологии диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза

Широкое распространение лекарственно-устойчивого туберкулеза является общемировой проблемой и способно негативно повлиять на ситуацию по туберкулезу в глобальном масштабе. Быстрая диагностика заболевания и раннее начало эффективного лечения, основанного на подборе персонализированных режимов химиотерапии, лежат в основе предотвращения распространения туберкулеза. Особое значение для диагностики туберкулеза имеют микробиологические методы, которые позволяют обосновать этиологию процесса и определить лекарственную чувствительность возбудителя. В обзоре рассматриваются актуальные и разрабатываемые методы микробиологической диагностики туберкулеза, включая классические микробиологические (микроскопия диагностического материала; культуральные исследования на плотных и жидких питательных средах) и современные молекулярно-генетические (ДНК-стрипы; биологические микрочипы; мультиплексная ПЦР; GeneXpert и другие тесты). Оценивается место описанных методов в диагностическом алгоритме лабораторий фтизиатрического профиля. На примере работы отдела микробиологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза (ЦНИИТ) иллюстрируется эффективность применения современных разработок в диагностике лекарственно-устойчивого туберкулеза и их влияние на улучшение терапии в клинических отделениях. Рассматриваются дальнейшие перспективы диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза, связанные с внедрением новейших технологий. В заключение обобщена информация о современном состоянии микробиологической диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза, подчеркивается важность разработки и внедрения в диагностический процесс новейших технологий.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, культуральная диагностика, молекулярно-генетические методы, ПЦР, секвенирование.

(Для цитирования: Эргешов А.Э., Черноусова Л.Н., Андреевская С.Н. Новые технологии микробиологической диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза. Вестник РАМН. 2019;74(6):XXX–XXX. doi: 10.15690/vramn1163)

428

Введение

Широкое распространение лекарственно-устойчивого туберкулеза является общемировой проблемой. В России за последние 10 лет на фоне снижения основных показателей по туберкулезу (заболеваемости — на 43,2 %, распространенности — на 42,4 %, смертности — на 64,2 %) зафиксирован рост распространенности туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) с 23,4 (в 2008) до 55,3 % (в 2018) и рост первичной лекарственной устойчивости с 13,6 (в 2008) до 29,3 % (в 2018) [1].

Быстрая диагностика заболевания и раннее начало эффективного лечения, основанного на подборе персон-

ализированных режимов химиотерапии, лежат в основе предотвращения распространения туберкулеза. В Глобальном докладе по туберкулезу Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) отмечается: «Если бы все больные туберкулезом имели доступ к своевременной диагностике и лечению высокого качества, то уровень смертности среди пациентов был бы низким во всех странах» [2, 3].

Особое значение для диагностики туберкулеза имеют микробиологические методы, которые позволяют обосновать этиологию процесса и определить лекарственную чувствительность возбудителя. Поэтому по итогам первой Глобальной министерской конференции ВОЗ «Ликвидировать туберкулез. Многосекторальный подход», которая прошла в ноябре 2017 г. в Москве, в качестве ключевых

A.E. Ergeshov, L.N. Chernousova, S.N. Andreyevskaya

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

New Technologies for the Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis

Widespread drug-resistant tuberculosis is a global challenge that has a potential to have a negative impact on the global TB situation. Rapid TB diagnosis and early initiation of effective treatment based on the individualized chemotherapy regimens underpin efforts in prevention of further spread of tuberculosis. Microbiological methods of TB diagnosis that provide evidence of the TB process etiology and identify drug susceptibility of the pathogen play a very important role. The review covers the current and emerging methods of the microbiological TB diagnosis including conventional microbiological (microscopy of diagnostic material, cultural studies on solid media and culture fluids) and modern molecular genetic tests (DNA strips, biological microchips, multiplex PCR, GeneXpert and diagnostic systems of the new generation and point-of-care tests) and demonstrates the role of the described methods in the diagnostic TB laboratory algorithm. The example of the Microbiology Department of the Central TB Research Institute illustrates the effectiveness of modern developments in the diagnosis of drug-resistant tuberculosis and their impact on improving treatment success in the clinical departments of the CTRI. The review presents further prospects of drug-resistant TB diagnosis in relation to the new technologies such as Next Generation Sequencing. The conclusion summarizes information on the current state of microbiological diagnosis of drug-resistant tuberculosis and emphasizes the importance of developing and introducing new technologies into the diagnostic process.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, drug resistance, diagnosis by culture, molecular genetic methods, PCR, sequencing.

(For citation: Ergeshov AE, Chernousova LN, Andreyevskaya SN. New technologies for the microbiological diagnosis of drug-resistant tuberculosis. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2019;74(6):XXX–XXX. doi: 10.15690/vramn1163)

стратегических направлений, ориентированных на ликвидацию туберкулеза в мире, была названа разработка новых диагностических алгоритмов, включающих совершенствование микробиологической диагностики туберкулеза.

Микроскопические и культуральные исследования — классические методы микробиологической диагностики туберкулеза

Традиционные микробиологические методы диагностики туберкулеза — микроскопия диагностического материала и культуральные исследования — сохраняют свою актуальность.

Микроскопия не имеет прямого отношения к диагностике лекарственной устойчивости, несмотря на невысокую чувствительность и специфичность метода, позволяет быстро и с минимальными финансовыми затратами оценить массивность бактериовыделения и осуществить контроль эффективности химиотерапии, в том числе лекарственно-устойчивых форм туберкулеза [4–6].

Так как методы микроскопии имеют низкую пропускную способность и оказывают высокую нагрузку на зрение микроскописта, современные разработки в этой области направлены на оцифровку изображения и передачу его на экран монитора. Большое значение уделяется и портативности оборудования. Например, цифровой флуоресцентный микроскоп с аккумуляторным питанием CellScope (Fletcher Lab, UC Berkeley, США) имеет малые размеры (20 × 20 × 10 см) и массу (около 3 кг). Система была создана на основе микроскопа с увеличением на 200, но генерируемые на экран цифровые изображения могут быть увеличены непосредственно на экране монитора до 3500 без потери резкости [7].

Существенно снизить трудоемкость процесса микроскопии и увеличить пропускную способность метода позволит автоматизированная система TBDx (Signature Mapping Medical Sciences, США), которая автоматически загружает окрашенные мазки и проводит анализ цифрового изображения. Эта платформа состоит из высококачественного микроскопа и системы визуализации. В минимальной комплектации система может автоматически обрабатывать 1–4 мазка, а при оснащении роботизированной каруселью для загрузки стекол — от 50 до 200 мазков. Запатентованное программное обеспечение считывает изображения для обнаружения окрашенных клеток. Чтение каждого мазка занимает около 5 мин, следовательно, анализ 200 мазков занимает около 16 ч без участия оператора [8]. Для окрашивания мазков перед внесением в систему могут быть использованы автоматизированные высокопроизводительные окрашивающие платформы, например RAL Stainer (RAL Diagnostics, Франция) или Aerospray TB Series 2 (ELITechGroup, Франция). Изучение целесообразности применения TBDx для диагностики туберкулеза, проведенное в Южной Африке, продемонстрировало, что результаты, полученные с использованием автономной системы, оказались сопоставимы с результатами, получаемыми опытными микроскопистами, поэтому TBDx является идеальным диагностическим решением в ситуации отсутствия квалифицированных специалистов [9, 10].

Интересное решение для автоматизации микроскопии было предложено ранее корпорацией Becton Dickinson (далее BD; США). В 2015 г. ими был анонсирован прибор Microimager с полной автоматизацией процесса

микроскопии, включающей, помимо загрузки мазков и анализа изображения, процедуру окрашивания мазков [11]. К сожалению, из-за технических сложностей производитель отказалась от разработки этого инструмента и поэтому он не появится на рынке.

Культуральные исследования — «золотой стандарт» в диагностике ЛУ ТБ. Основная проблема культуральной диагностики ТБ связана с тем, что микобактерии туберкулеза (МБТ) относятся к медленнорастущим микроорганизмам. Традиционно используемое культивирование на плотных питательных средах позволяет получить видимый рост культуры в сроки от 2 нед до 3 мес, и затем провести тест на чувствительность к противотуберкулезным препаратам (ПТП), который занимает от 3 до 4 нед. Следовательно, от момента получения диагностического материала до момента установления лекарственной чувствительности на плотных питательных средах может пройти более 3 мес. Поэтому главным направлением совершенствования культуральной диагностики туберкулеза является сокращение времени получения результата исследования. Прогресс в этой области был достигнут еще в конце прошлого века за счет разработки и внедрения коммерческих систем культивирования микобактерий на жидких питательных средах с автоматизированной регистрацией роста и с тех пор не было предложено никаких инноваций. Сегодня на рынке представлены три производителя автоматизированных систем на основе культивирования в жидких средах: BacT/ALERT3D (bioMérieux, Франция), BACTEC MGIT (BD, США) и относительно новый продукт — платформа Mycolor TK (Salubris, Турция) [12–14].

Использование современных технологий культивирования микобактерий на жидких средах с автоматической регистрацией роста позволило сократить сроки получения культуры в среднем до 10 сут, а также повысить выявление микобактерий туберкулеза на 10–15 % по сравнению с культивированием на плотных питательных средах [4, 6, 13].

В России с 2003 г. используется технология BACTEC MGIT. Преимущества автоматизированной системы культивирования BACTEC MGIT 960/320 перед культуральными исследованиями на плотных питательных средах обеспечиваются высокой эффективностью стандартизованных и сертифицированных по ISO9001 производств реагентов и сред, а также поддержанием стандартных протоколов исследований. Испытания и валидирование технологии были проведены в Центральном научно-исследовательском институте туберкулеза (ЦНИИТ), который с 2008 г. является учебным центром № 1 на право проводить обучение работе на BACTEC MGIT. За время существования центра было обучено более 300 врачей-бактериологов.

Использование BACTEC MGIT 960 позволяет в короткие сроки после получения культуры определять лекарственную чувствительность ко всем противотуберкулезным препаратам 1-го ряда и большинству препаратов 2-го ряда [5, 6, 13, 15]. В 2015 г. для унификации определения лекарственной чувствительности микобактерии туберкулеза микробиологами ЦНИИТ были разработаны Стандартные операционные процедуры на определение лекарственной чувствительности к 10 препаратам [16]. Недавно проведенное исследование (совместно с Владимирским Областным противотуберкулезным диспансером) позволило расширить спектр препаратов для определения ЛУ в системе BACTEC MGIT 960, впервые установив критические концентрации для определения

лекарственной чувствительности к циклосерину и ПАСК (пара-аминосалициловая кислота) [17].

В целом системы с автоматической регистрацией роста культуры в жидкой среде являются совершенным инструментом для проведения культуральной диагностики туберкулеза и постановки тестов лекарственной чувствительности, но высокая стоимость оборудования делает их недоступными для повсеместного применения. Поэтому для стран с низким экономическим уровнем ВОЗ рекомендует использование недорогих некоммерческих методов, таких как MODS (от *microscopic-observation drug-susceptibility* — *микроскопическая детекция лекарственной чувствительности*). Метод MODS заключается в микроскопической детекции начала роста культуры в жидкой среде, причем выявление роста микобактерий туберкулеза. Определение лекарственной чувствительности проводится параллельно путем одновременного посева диагностического материала на среду для выявления микобактерий туберкулеза и на среды с противотуберкулезными препаратами. Такой подход, по данным мультицентрового исследования, позволял получить результат устойчивости к противотуберкулезным препаратам в среднем через 14,3 дня, в то время как на BACTEC MGIT аналогичный результат был получен в среднем через 24,7 дня [18]. Усовершенствование метода MODS было предложено группой исследователей из лаборатории инфекционных болезней университета Peruana Cayetano Heredia (Лима, Перу) при поддержке Wellcome Trust. Использование индикатора 3-дифенил-5-(2-тиенил) тетразолия, меняющего цвет при росте культуры, позволило контролировать рост микроколоний по изменению цвета среды и только после этого проводить подтверждающие микроскопические исследования [19].

Молекулярно-генетические тест-системы в диагностике лекарственно-устойчивого туберкулеза

Применение для диагностики туберкулеза молекулярно-генетических методов позволяет сократить срок получения результата анализа до 1 сут, что делает это направление наиболее перспективным и востребованным [20]. Лежащий в основе молекулярно-генетической диагностики метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в различных ее вариантах позволяет использовать для анализа диагностический материал, выделенный от больных: выявление видоспецифических фрагментов ДНК возбудителя свидетельствует о наличии в образце микобактерий туберкулеза, и выявлять мутации в генах, ассоциированных с резистентностью.

Рынок молекулярно-генетических технологий сегодня максимально насыщен разнообразными разработками, и важно понимать, какой из существующих методов целесообразно применять в клинико-диагностических лабораториях разных уровней. В настоящее время при определении лекарственной чувствительности молекулярно-генетическими методами используется несколько подходов. Все они основаны на знаниях о мутациях, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к тому или иному противотуберкулезному препарату [21].

Гибридизационные технологии определения генотипической лекарственной устойчивости, основанные на связывании продуктов ПЦР со специфическими зондами-олигонуклеотидами, иммобилизованными на матрице, которая представляет собой биологический

микрочип или ДНК-стрип, широко применяются у нас в стране и за рубежом.

ДНК-стрипы являются относительно недорогим методом, но обладают достаточно низкой чувствительностью, а следовательно, могут быть применены для образцов с положительным микроскопическим исследованием или для определения генотипической устойчивости у культур микобактерий. На мировом рынке присутствует несколько компаний-производителей ДНК-стрипов для определения генотипической устойчивости, два из которых — наборы производства Hain Lifescience и INNO-LiPA — одобрены ВОЗ [11, 22].

В Российской Федерации применяются ДНК-стрипы производства Hain Lifescience (Германия): GenoType MTBDRplus, позволяющий определять устойчивость микобактерий туберкулеза к рифампицину и изониазиду, и GenoType MTBDRsl, предназначенный для определения устойчивости к фторхинолонам, этамбутолу и аминогликозидам/циклическим пептидам. Группа экспертов ВОЗ по данным метаанализа отметила высокую специфичность ДНК-стриповой тест-системы на определение устойчивости к рифампицину и изониазиду (98 и 92 % соответственно по каждому препарату) и высокую чувствительность (≥ 90 %), а чувствительность и специфичность тест-системы GenoType MTBDRsl была признана удовлетворительной (≥ 70 и ≥ 81 % соответственно) [22, 23].

В 2011 г. ЦНИИТ проводил испытания и валидацию систем Hain Lifescience, а также обучение специалистов и распространение этой технологии.

Биологические микрочипы представляют собой более совершенный инструмент по сравнению с ДНК-стрипами, поскольку нанесение большого количества зондов на маленькой поверхности повышает информативность анализа и имеет потенциал для дальнейшего расширения числа мишеней. Считывание результатов проводится с помощью специальных приборов по интенсивности флюоресценции, а анализ результатов осуществляется с использованием специального программного обеспечения.

Первые отечественные микрочипы начали разрабатываться с 2000 г. группой исследователей из Института молекулярной биологии РАН с участием ЦНИИТ и Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом и были первыми в мире [24]. Тест-система «ТБ-Биочип-1» позволяет определить 27 точечных мутаций в гене *rpoB*, связанных с устойчивостью к рифампицину, и мутации в генах *katG* (11 мутаций), *inhA* (5 мутаций) и *ahpC* (5 мутаций), которые ассоциированы с устойчивостью к изониазиду. Специфичность метода составляет 95 % при установлении устойчивости к рифампицину и более 80 % — к изониазиду, предел детекции метода — не менее 500 геном-эквивалентов в пробе ПЦР [25]. «ТБ-Биочип-2» выявляет 10 вариантов точечных мутаций в гене *gyrA*, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, а его специфичность составляет не менее 80 % [26]. Относительно новый продукт — набор «ТБ-тест» — позволяет в формате одного чипа выявлять ДНК микобактерий, определять мутации в генах *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*, *embB*, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, аминогликозидам, циклическим пептидам и фторхинолонам, а также устанавливать генотипическую линию микобактерий [27].

В целом, несмотря на простоту анализа, для должного использования гибридизационных технологий необходимо зонирование лаборатории и наличие оборудования для

различных процессов (выделение ДНК, амплификация, гибридизация и интерпретация данных), поэтому определение лекарственной чувствительности с использованием гибридизационных технологий возможно только в крупных диагностических центрах фтизиатрического профиля с высококвалифицированным персоналом.

Картридная технология GeneXpert (Cepheid, США), напротив, позволяет максимально упростить процесс анализа и в очень короткие сроки (в течение 2 ч) одновременно выявлять видоспецифические последовательности ДНК МБТ и с высокой достоверностью определять устойчивость микобактерий туберкулеза к рифампицину. Для диагностики устойчивости к рифампицину используются молекулярные зонды, перекрывающие всю целевую поверхность гена *rpoB* [28]. Применение этой тест-системы полностью исключает риск контаминации, так как и выделение ДНК, и амплификация происходят последовательно в закрытом картридже. Поэтому метод может быть использован в неспециализированных лабораториях. Технология была разработана в США в 2009 г., одобрена ВОЗ и рекомендована для быстрой диагностики туберкулеза, особенно в странах с высоким уровнем распространенности туберкулеза и распространением ВИЧ-инфекции. Данная технология позволяет выявлять устойчивость к рифампицину с чувствительностью 99,1 % и исключать устойчивость со 100 % специфичностью. В 2011 г. в отделе микробиологии ЦНИИТ в сотрудничестве с Центром по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention, CDC; США) проведена валидация технологии, а в 2013 г. технология получила распространение по всей России [29, 30].

Несмотря на то, что использование картридной технологии для диагностики представляется дорогим для большинства стран с низким и средним уровнем экономики, для которых характерен высокий уровень заболеваемости туберкулезом, технология GeneXpert остается доминирующей на мировом рынке продуктов для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и продолжает активно развиваться.

Недавно компания Cepheid выпустила новый картридж Xpert MTB/RIF Ultra, который имеет большую чувствительность и требует меньше времени проведения анализа по сравнению со своим прототипом, а также разрабатывает новый картридж Xpert XDR для подтверждения МЛУ и определения широкой лекарственной устойчивости возбудителя (определяет устойчивость к изониазиду, фторхинолонам и аминогликозидам) [31].

Кроме этого, компания Cepheid объявила о разработке нового продукта GeneXpert Omni — портативного прибора с аккумуляторным питанием, предназначенного для работы с картриджами Xpert в периферийных лабораториях или в полевых условиях [11, 31].

Наиболее перспективной технологией определения генотипической устойчивости является мультиплексная ПЦР. Ее основным преимуществом по сравнению с гибридизационными технологиями являются отсутствие этапа гибридизации и оценка результатов в режиме реального времени, что сокращает время анализа, сводит к минимуму риск контаминации и оптимально для лабораторий с большим потоком анализов.

Сегодня в мире существует достаточно большое число подобных наборов, которые не имеют сертификации ВОЗ, но одобрены национальными надзорными органами, однако первая такая система была разработана в России в 2010 г. при сотрудничестве ЦНИИТ и компании «Синтол» для выявления мутаций, ассоцииро-

ванных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, с использованием оригинальной мультиконкурентной аллельспецифичной ПЦР в режиме реального времени. Эта тест-система позволяет в формате одного ПЦР-стрипа определить устойчивость к рифампицину и изониазиду за счет выявления наиболее распространенных точечных мутаций в генах *rpoB* (11 вариантов), *katG* (3 варианта) и *inhA* (1 вариант). Совпадение результатов применения этой тест-системы с данными культуральной диагностики составляет 94 % [32, 33]. Новой тест-системой, зарегистрированной в Российской Федерации в 2017 г., является набор «Амплитуб-*FQ-PB*» (Синтол, Россия), позволяющий в режиме реального времени выявлять генетические маркеры ДНК микобактерий туберкулезного комплекса, ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам, с диагностической чувствительностью 97 % и аналитической чувствительностью не более 100 клеток микобактерий туберкулеза на образец и специфичностью 98 %. Комбинация «Амплитуб-*MLU-PB*» и «Амплитуб-*FQ-PB*» позволяет с наименьшими материальными и временными затратами выявлять резистентность микобактерий туберкулеза непосредственно в диагностическом образце.

Новейшие диагностические системы, которые были выпущены на рынок только в прошлом году, характеризуются низкой стоимостью анализа, быстрым получением результата, высокой надежностью и мобильностью оборудования. Для проведения анализа используются картриджи или чипы нового поколения, использующие технологию lab-on-chip.

Тест Truenat MTB (Molbio Diagnostics, Индия) представляет собой ПЦР в режиме реального времени в формате микрочипа, проходящую в портативном устройстве с питанием от аккумулятора, результат которой можно получить менее чем за час. Обработка мокроты и выделение ДНК осуществляется в приборе для подготовки образцов также с аккумуляторным питанием, с использованием протокола на основе наночастиц. По сообщениям производителей, чувствительность и специфичность Truenat MTB подобны Xpert MTB/RIF [34].

Набор Mycobacterium iD Test-kit, используемый в комплекте с инструментом Genedrive (Epistem Ltd., Великобритания), также предназначен для выявления ДНК возбудителя и определения устойчивости к рифампицину методом ПЦР в режиме реального времени. Для проведения теста требуется минимальная подготовка диагностического материала, заключающаяся в нанесении и инкубации образца на специальной лизирующей бумаге, которая затем помещается в картридж. Устройство Genedrive позволяет за один раз тестировать один образец мокроты (1 картридж) в течение одного часа с чувствительностью и специфичностью более 95 % [35].

Тест VereMTB (Veredus Laboratories, Сингапур) выпущен на рынок для использования только в исследовательских целях, но не для клинической диагностики, и используется совместно с платформой VerePLEX Lab-on-Chip. Данная тест-система позволяет проводить тест на наличие в диагностическом образце *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae* / *kansasii* / *scrofulaceum*, *Mycobacterium abscessus* / *chelonae*, *Mycobacterium xenopi* и *Mycobacterium fortuitum*, а также определять устойчивость к рифампицину и изониазиду с пределом детекции 100 геном-эквивалентов. Время получения результата без учета времени, затрачиваемого на выделение ДНК, составляет менее 3 ч [36, 37].

Готовятся к выходу на рынок и новые тест-системы, основной акцент в которых сделан на возможности их применения в формате point-of-care (у постели больного), для чего создаются портативные инструменты с аккумуляторным питанием, обеспечивающие быстрое получение результата с минимальным участием оператора. Они, как и описанные выше тест-системы нового поколения, предназначены для выявления МБТ и определения генотипической резистентности к рифампицину или, реже, к рифампицину и изониазиду [11].

Несмотря на то, что были достигнуты успехи в разработке методов молекулярной диагностики туберкулеза, сложная процедура выделения ДНК остается существенным препятствием для повсеместного распространения этих технологий. Учитывая, что в качестве диагностического материала при выявлении туберкулеза чаще всего используется мокрота, представляющая собой вязкую субстанцию вследствие большого содержания муцинов, к реагентам для пробоподготовки образцов мокроты предъявляются особые требования, обязательным из которых является эффективное разжижение образца. Кроме того, необходимо учитывать, что клеточная стенка представителей рода *Mycobacterium* отличается высокой прочностью и устойчивостью к различным химическим воздействиям. Для совершенствования этапа выделения ДНК компанией «Синтол» в сотрудничестве с ЦНИИТ был разработан реагент «Амплитуб-Преп», содержащий компоненты, обладающие муколизующими свойствами, и компоненты, способствующие разрушению внешнего липидного слоя клеточной стенки микобактерий, вследствие чего достигается полная гомогенизация и разжижение респираторных образцов, разрушение внешнего слоя клеточной стенки микобактерий при полной сохранности ДНК микобактерий [38]. Применение данного реагента существенно облегчает работу с диагностическим образцом при проведении молекулярно-генетических методов диагностики, однако выделение ДНК микобактерий остается длительным и трудоемким процессом, требующим высокой концентрации внимания персонала.

Для упрощения этапа выделения ДНК возможно использование роботизированных станций, позволяющих автоматизировать рутинные лабораторные процедуры, исключая влияние «человеческого фактора», что приводит к снижению числа ошибок, повышению производительности и биобезопасности и, в конечном итоге, улучшает качество исследования.

В настоящее время на рынке доступны три платформы: m2000sp (Abbott Molecular, США), COBAS (Roche Diagnostics, Швейцария) и высокопроизводительная платформа компании Hain Lifescience (Германия), включающая прибор GenoXtract 96 для выделения ДНК в формате 96-луночного планшета и прибор FluoroCycler 96 для последующего проведения амплификации [11, 39, 40]. Две платформы находятся в разработке — BD MAX (BD, США) и ProT Workt WorkTop TruTip (Akonni Biosystems, США) [41, 42]. Все закрытые платформы для выделения ДНК имеют параметры, жестко заданные производителем, и приспособлены для работы с реагентами и расходными материалами той же фирмы. Изменение рабочего алгоритма пользователем невозможно. Несмотря на то, что за счет этого обеспечивается высокая надежность получаемого результата, возможности диагностической лаборатории оказываются ограничены, «привязывая» рабочий процесс к определенному производителю. Поэтому в ЦНИИТ в работу отдела микробиологии для автоматизированного выделения ДНК

из диагностического материала внедрена платформа Freedom EVO 150 (Tecan, Швейцария). Эта роботизированная станция способна к любой модернизации в зависимости от потребностей пользователя путем изменения конфигурации рабочего стола, набора манипуляторов и программирования прибора и позволяет использовать любые типы одноразового пластика и наборы реагентов, в том числе и отечественного производства. В результате ее внедрения была повышена чувствительность молекулярно-генетических тестов, снижены трудозатраты и вероятность контаминации при выделении ДНК и увеличен поток проводимых анализов [43].

Из приведенной выше информации следует, что существующие методы молекулярно-генетической диагностики лекарственной устойчивости предъявляют разные требования к инфраструктуре лаборатории и квалификации специалистов.

Представляется целесообразным на базе уже существующих ПЦР-лабораторий использовать автоматизированные станции для выделения ДНК, а для диагностики лекарственной чувствительности применять гибридные или основанные на ПЦР в режиме реального времени методы, тем самым увеличив пропускную способность лаборатории.

При оборудовании неспециализированных лабораторий акцент должен быть сделан на различные варианты технологий, подразумевающих минимальную квалификацию персонала и не требующих зонирования помещений, такие как GeneXpert, TrueNat и т.д.

Рационально ли применять картриджные системы и подобные инструменты в специализированных противотуберкулезных лабораториях высокого уровня? На наш взгляд, при необходимости экстренной диагностики это оборудование может быть использовано, но во всех остальных случаях, особенно при большом потоке образцов, смысла в их ежедневном применении нет. Например, в отделе микробиологии ЦНИИТ существует отработанный диагностический алгоритм, который позволяет при поступлении диагностического материала утром к середине рабочего дня получать результат о наличии в образце ДНК МБТ и при достаточном количестве ДНК — к утру следующего дня иметь информацию о чувствительности к основным противотуберкулезным препаратам — рифампицину, изониазиду и фторхинолонам (работы проводятся с использованием автоматизированной станции Freedom Evo, реагента для предобработки «Амплитуб-Преп» и наборов для выделения ДНК и амплификации производства «Синтол», Россия).

Секвенирование — будущее диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза

Говоря о дальнейших перспективах лабораторной диагностики туберкулеза, необходимо отметить новейшие технологии секвенирования, так называемое секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS), пришедшее на смену методу Сэнгера [44, 45]. Технологии NGS способны в короткий промежуток времени (часы-дни) обеспечить прочтение участков бактериальных геномов разной протяженности, которые затем могут быть собраны в более длинные или даже целые геномные последовательности с использованием биоинформатики.

Благодаря этому из одного образца можно получить исчерпывающую информацию о возбудителе, включа-

ющую видовую идентификацию, определение генетических детерминант, ассоциированных с лекарственной устойчивостью ко всему спектру противотуберкулезных препаратов, и определить молекулярно-эпидемиологические маркеры, устанавливающие принадлежность микобактерий туберкулеза к мировым штаммовым линиям.

В настоящее время на рынке представлено множество платформ для NGS, в том числе инструменты со средней и высокой пропускной способностью, например Bio-Rad Laboratories (GnuBio); Illumina (MiSeq, HiSeq и NextSeq); Oxford Nanopore (minION, PromethION, GridION); PacBio (Sequel и RS2); Thermo Fisher (SOLiD, S5, personal genome machine [PGM], Proton); Qiagen (GeneReader) и Vela Diagnostics NGS platform (Singapore). Перечисленные платформы отличаются друг от друга размером и стоимостью одного «чтения» и частотой ошибок. Причем размер чтения часто является критическим параметром при работе с микобактериями. Дело в том, что геном противотуберкулезным препаратам содержит множественные повторяющиеся элементы, длина которых составляет от сотен до тысяч пар оснований (п.о.). NGS, обеспечивающие короткие «чтения» (менее 1000 п.о.), например, производства Illumina и Thermo Fisher, не способны перекрыть эти повторы, что делает невозможной сборку полного генома. Однако NGS, способные делать длинные «чтения» (более 5000 п.о.), такие как технологии PacBio и Oxford Nanopore, лишены такого недостатка [46, 47]. При этом платформы, осуществляющие короткие «чтения», идеальны для таргетного секвенирования, позволяющего детально изучить последовательность любого из генов, ассоциированных с ЛУ.

Для определения точной генетической основы резистентности к большинству противотуберкулезным препаратам созданы базы данных, такие как TBDreamDB и MUBII-TB-DB, содержащие информацию о мутациях, ассоциированных с лекарственной устойчивостью [48–51]. Дополнительно разработан программный инструмент «TV profiler», основанный на информации об устойчивости микобактерий туберкулеза к 11 препаратам вследствие 1325 мутаций, который позволяет обработать данные секвенирования и предсказать ЛУ *in silico* [52]. Уже существуют исследования с достаточной степенью надежности предсказывающие устойчивость по данным полногеномного секвенирования культур МБТ [53, 54].

Существует ряд проблем, с которым может столкнуться реализация NGS в клинических целях [55, 56]. Во-первых, это количество и качество исследуемой ДНК: могут возникнуть трудности при тестировании олигобациллярных клинических образцов из-за недостаточного количества материала для анализа. Кроме того, картина секвенирования может быть искажена вследствие примеси ДНК неспецифической микрофлоры. Поэтому современные пилотные исследования в качестве источника ДНК используют, как правило, чистую культуру возбудителя [54, 57].

Во-вторых, определенную проблему для широкого распространения NGS представляет огромный массив данных, получаемый при проведении исследований. Обработка данных подразумевает картирование (mapping) или сборку генома, определение базового варианта и сравнительный филогенетический анализ. Программное обеспечение и алгоритмы для каждого из этих этапов достаточно сложны и требуют навыков биоинформатики.

Частично решить эту проблему позволит платформа Re-Seq, которая была запущена в апреле 2016 г. и позво-

ляет в свободном доступе любым лабораториям загружать и анализировать данные NGS [58].

Следовательно, в настоящее время подготовка образцов, сама процедура секвенирования и обработка полученных данных представляют собой сложный процесс, требующий участия высококвалифицированного персонала. Тем не менее в NGS-технологиях заложен большой потенциал для совершенствования диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза.

Недавнее мультицентровое исследование, направленное на оценку эффективности полногеномного секвенирования при диагностике микобактериальных инфекций, в том числе с определением резистентности, продемонстрировало высокую степень совпадения с культуральными методами (93 %), а также позволило выявить вспышку заболевания, идентифицировав специфический, устойчивый к изониазиду кластер микобактерий туберкулеза. Кроме того, было показано, что применение для диагностики секвенирования хоть и незначительно (на 7 %), но было более экономичным в плане материальных затрат [54]. Тот факт, что результаты секвенирования с определением устойчивости ко всему спектру лекарственных средств возможно получить в среднем в течение 5 дней, делают этот подход безусловным лидером среди всех существующих диагностических алгоритмов.

И хотя технологии секвенирования в настоящее время недоступны для большинства стран с низким и средним уровнем экономики, тем не менее стоимость оборудования и реагентов продолжает падать, а технологии — совершенствоваться, и в обозримом будущем появятся возможности широко распространить технологию.

Кроме того, с развитием новых схем терапии туберкулеза, в том числе с применением новых препаратов, параллельно должны развиваться и диагностические алгоритмы, позволяющие своевременно выявлять случаи резистентности при применении новых схем. Полногеномное секвенирование идеально подходит для этих задач.

Подводя итог, можно сказать, что на современном этапе классическими методами микробиологической диагностики туберкулеза остаются микроскопия и культуральные исследования, а для ускорения получения результатов выявления возбудителя и определения лекарственной устойчивости внедрены молекулярно-генетические методы.

Совершенствованию микробиологической диагностики туберкулеза, особенно лекарственно-устойчивых форм, уделяется большое значение в мире. Новейшие разработки в области микробиологической диагностики туберкулеза направлены на сокращение времени получения результата анализа, повышение специфичности и чувствительности, снижение трудозатрат, минимизацию количества манипуляций с диагностическим материалом для повышения биобезопасности, сокращение числа и стоимости необходимого оборудования.

Для повышения эффективности и снижения стоимости обследования мировыми экспертами вносятся поправки в существующие диагностические алгоритмы, на наш взгляд, не всегда обоснованные. Так, в соответствии с последними рекомендациями, ВОЗ предлагает отказаться от проведения методов бактериоскопии как маркеров с низкой чувствительностью и неспецифич- ~~ного~~ и заменить их молекулярными экспресс-тестами, а последующее микроскопическое исследование мазка мокроты для оценки бактериальной нагрузки и степени контагиозности пациента проводить только при полу-

чении положительного результата молекулярного метода [59]. Однако именно неспецифичность бактериоскопии, т.е. тот факт, что она выявляет любые кислотоустойчивые бактерии, делает ее незаменимым методом диагностики, не позволяющим пропустить случаи инфицирования нетуберкулезными микобактериями (НТМБ), вызывающими микобактериоз: при применении на первом этапе диагностики молекулярно-генетических методов, образцы, отрицательные на наличие ДНК МБТ, будут исключены из исследования. Следовательно, исключение микроскопии из первого этапа диагностического алгоритма приведет к тому, что больные с микобактериозом выпадут из поля зрения фтизиатров или при отсутствии должной видовой дифференциации и с учетом природной резистентности других микобактерий будут недостаточно диагностированы. В настоящее время нормативными документами регламентировано, что в непрофильных медицинских организациях обязательным диагностическим исследованием при подозрении на туберкулез является микроскопическое исследование трех проб мокроты на наличие кислотоустойчивых бактерий, что, на наш взгляд, является более правильным подходом, поскольку положительный результат бактериоскопии при отрицательном результате молекулярного теста позволяет предположить присутствие нетуберкулезных микобактерий [5, 60].

Важно отметить, что на современном этапе развития диагностики **ТБ** определение лекарственной чувствительности возбудителя молекулярно-генетическими методами является первоначальным этапом обследования больного, так как позволяет с высокой надежностью определять резистентность к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, что дает возможность определять поток больных туберкулезом с лекарственной устойчивостью на этапе поступления в стационар. Для полной диагностики необходимо применение культуральных методов, так как диагностическая ценность молекулярно-генетических тестов для определения устойчивости недостаточна для назначения корректного режима терапии.

С 2011 г. в отделе микробиологии ЦНИИТ был внедрен алгоритм диагностики, основанный на комбинации двух ускоренных методов выявления возбудителя и определения его лекарственной чувствительности. На первом этапе проводится скрининговое исследование диагностического материала молекулярно-генетическими методами, что позволяет за 1–2 дня получить результаты идентификации мутаций, связанных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, и таким образом установить устойчивость возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам. По результатам этого этапа анализа происходит госпитализация больных с множественной лекарственной устойчивостью в специализированное отделение. На втором этапе проводится определение фенотипической лекарственной чувствительности с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960. По результатам этого этапа больному назначается индивидуальная схема химиотерапии, включающая максимально возможное число препаратов, к которым сохранилась чувствительность возбудителя [33].

По итогам внедрения данного алгоритма в 2014 г. были разработаны методические рекомендации по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания, которые затем были закреплены Приказом МЗ РФ № 951 от 29 декабря 2014 г. [5, 6, 61, 62].

Уже сейчас при соблюдении представленного алгоритма в комбинации с клиническими методами возмож-

но существенное повышение эффективности терапии лекарственной устойчивости туберкулеза. Так, в ЦНИИТ для лечения лекарственной устойчивости туберкулеза разработан комплексный подход, базирующийся на раннем назначении химиотерапии по данным ускоренных методов определения лекарственной чувствительности, с включением в схему новейших препаратов, таких как линезолид, бедаквилин и последние генерации фторхинолонов, а также использующий оригинальные методы патогенетической терапии и хирургические технологии. Благодаря внедрению этого подхода эффективность лечения больных множественной лекарственной устойчивостью в ЦНИИТ в 2016 г. достигла 85,7 % (по сравнению с 52 % в мире и 53,8 % в среднем по РФ), а с широкой лекарственной устойчивостью **ТБ** — 79,4 % (по сравнению с 28 % в мире) [3].

Однако, несмотря на достигнутые успехи в терапии, необходимо и дальше совершенствовать диагностику лекарственной устойчивости туберкулеза. Учитывая, что, по нашим данным, отмечается неблагоприятная динамика расширения спектров лекарственной резистентности возбудителя туберкулеза, возможность определения лекарственной устойчивости молекулярно-генетическими методами лишь к 3 препаратам представляется явно недостаточной [63]. Актуальна разработка новых молекулярных отечественных тест-систем, позволяющих с высокой достоверностью определять лекарственную устойчивость к широкому спектру противотуберкулезных препаратов 1-го и 2-го ряда для максимально раннего назначения адекватной химиотерапии.

Заключение

Итак, целесообразно ли внедрять на современном этапе в диагностику туберкулеза дорогостоящие технологии секвенирования? По нашему мнению, целесообразно, начиная с ведущих центров фтизиатрии. Здесь уместно будет вспомнить, что когда в 1995 г. по инициативе академика А.Г. Хоменко на базе отдела микробиологии ЦНИИТ была создана лаборатория молекулярно-генетической диагностики туберкулеза, метод ПЦР в то время представлялся дорогим и многими воспринимался скептически, пока не была наработана достаточная доказательная база. Постепенное удешевление ПЦР-технологий и внедрение отечественных разработок сделало ПЦР-диагностику туберкулеза, в том числе с лекарственной устойчивостью, одной из самых распространенных в Российской Федерации.

Кроме того, своевременное внедрение молекулярных технологий в ЦНИИТ в сотрудничестве с другими исследовательскими центрами способствовало созданию первых в мире тест-систем для диагностики лекарственной устойчивости туберкулеза: биочипы были созданы и внедрены в диагностический процесс в начале 2000-х, а мультиплексная ПЦР для определения устойчивости к рифампицину и изониазиду — в 2010 г. (приблизительно на 5 лет раньше, чем в других странах).

Также надо отнестись и к технологиям NGS и уже сегодня внедрять их в диагностическую практику на базе микробиологических лабораторий крупных фтизиатрических центров. И тогда, по мере развития и совершенствования технологий NGS в перспективе получат широкое распространение. Быстрое, в течение нескольких дней, получение в одном тесте полной информации

о возбудителе будет способствовать совершенствованию диагностики туберкулеза и, как следствие, повышению эффективности терапии, а также углублению знаний о биологических свойствах возбудителя туберкулеза, что выведет мероприятия по контролю за туберкулезом на новый уровень.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 05.586.21.0065 (Уникальный идентификатор соглашения RFMEFI58619X0065).

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов: Эргешов А.Э. — написание рукописи («Введение», «Секвенирование — будущее диагностики ЛУ ТБ», «Заключение»); Черноусова Л.Н. — написание рукописи («Классические методы микробиологической диагностики туберкулеза»); Андреевская С.Н. — написание рукописи («Молекулярно-генетические тест-системы в диагностике ЛУ ТБ»). Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Выражение признательности. Выражаем признательность Шишло Елене Валерьевне, помощнику директора ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», за техническое содействие при написании статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нечаева О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России // *Туберкулез и болезни легких*. — 2018. — Т.96. — №8. — С. 15–24. [Nechaeva OB. TB situation in Russia. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2018;96(8):15–24. (In Russ).] doi: 10.21292/2075-1230-2018-96-8-15-24.
2. World Health Organization. WHO/CDS/TB/2018.20 *Global tuberculosis report 2018*. Geneva: WHO; 2018.
3. Эргешов А.Э. Туберкулез в Российской Федерации: ситуация, проблемы и перспективы // *Вестник РАМН*. — 2018. — Т.73. — №5. — С. 330–337. [Ergeshov AE. Tuberculosis in the Russian Federation: situation, challenges and perspectives. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2018;73(5):330–337. (In Russ).] doi: 10.15690/vramn1023.
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 109 от 21 марта 2003 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation № 109 "O sovershenstvovani protivotuberkuleznykh meropriyatii v Rossiyskoi Federatsii", dated 21 March 2003. (In Russ).] Доступно по: <https://base.garant.ru/4179360/>. Ссылка активна на 15.08.2019.
5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 951 от 29 декабря 2014 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания». [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation "Ob utverzhdenii metodicheskikh rekomendatsii po sovershenstvovaniu diagnostiki i lecheniya tuberkuleza organov dykhaniia", dated 9 December 2014. (In Russ).] Доступно по: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70749840/>. Ссылка активна на 15.08.2019.
6. Черноусова Л.Н., Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., и др. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. — М., 2014. — 29 с. [Chernousova LN, Sevast'yanova EV, Larionova EE, et al. *Federal'nyye klinicheskiye rekomendatsii po organizatsii i provedeniiu mikrobiologicheskoi i molekuliarno-geneticheskoi diagnostiki tuberkuleza*. Moscow; 2014. 29 p. (In Russ).]
7. Tapley A, Switz N, Reber C, et al. Mobile digital fluorescence microscopy for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2013;51(6):1774–1778. doi: 10.1128/JCM.03432-12.
8. Lewis JJ, Chihota VN, van der Meulen M, et al. "Proof-of-concept" evaluation of an automated sputum smear microscopy system for tuberculosis diagnosis. *PLoS One*. 2012;7(11):e50173. doi: 10.1371/journal.pone.0050173.
9. Ismail NA, Omar SV, Lewis JJ, et al. Performance of a novel algorithm using automated digital microscopy for diagnosing tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(12):1443–1449. doi: 10.1164/rccm.201502-0390OC.
10. Jha S, Ismail N, Clark D, et al. Cost-effectiveness of automated digital microscopy for diagnosis of active tuberculosis. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157554. doi: 10.1371/journal.pone.0157554.
11. Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects. *J Infect Dis*. 2015;211(S2):S21–28. doi: 10.1093/infdis/jiu803.
12. Werngren J, Lisbeth K, Hoffner SE. Evaluation of a novel kit for use with the BacT/ALERT 3D system for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):2130–2132. doi: 10.1128/JCM.02218-05.
13. Cruciani M, Scarpato C, Malena M, et al. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):2321–2325. doi: 10.1128/jcm.42.5.2321-2325.2004.
14. Ciftci IH, Karakece E. Comparative evaluation of TK SLC-L, a rapid liquid mycobacterial culture medium, with the MGIT system. *BMC Infect Dis*. 2014;14:130. doi: 10.1186/1471-2334-14-130.
15. World Health Organization. WHO/CDS/TB/2018.5 *Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis*. Geneva: WHO; 2018.
16. Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., и др. Стандартные операционные процедуры. Определение чувствительности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам второго ряда с использованием системы BACTEC MGIT 960/320. — М., 2015. — 32 с. [Chernousova LN, Smirnova TG, Larionova EE, et al. *Standartnyye operatsionnyye protsedury. Opredeleniye chuvstvitel'nosti mikobakterii tuberkuleza k protivotuberkuleznym preparatam vtorogo riada s ispol'zovaniyem sistemy BACTEC MGIT 960/320*. Moscow; 2015. 32 p. (In Russ).]
17. Дюжик Е.С., Каунетис Н.В., Смирнова Т.Г., и др. Определение критической концентрации препаратов второго ряда (циклосерина и ПАСК) для постановки теста лекарственной чувствительности в жидкой среде Middlebrook 7H9 // *Туберкулез и болезни легких*. — 2016. — Т.94. — №1. — С. 28–33. [Dyuzhik ES, Kaunetis NV, Smirnova TG, et al. Defining critical concentrations of the second line TB drugs (cycloserin and PAS), to establish drug susceptibility testing on the liquid medium of Middlebrook 7H9. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2016;94(1):28–33. (In Russ).]

18. Catanzaro A, Rodwell TC, Catanzaro DG, et al. Performance comparison of three rapid tests for the diagnosis of drug-resistant tuberculosis. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136861. doi: 10.1371/journal.pone.0136861.
19. Ramos E, Schumacher SG, Siedner M, et al. Optimizing tuberculosis testing for basic laboratories. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(4):896–901. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0566.
20. World Health Organization and Stop TB Partnership. WHO/HTM/STB/2010.2 *The global plan to stop TB 2011–2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis*. Geneva: WHO; 2010.
21. Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н. Молекулярно-генетическая диагностика туберкулеза и ЛУ МБТ. В кн.: *Туберкулез органов дыхания. Руководство для врачей*. / Под ред. проф. А.Э. Эргешова. — М.: Галлея-Принт, 2017. — С. 213–224. [Smirnova TG, Andreevskaya SN, Chernousova LN. *Molecularly- and genetically diagnosis of tuberculosis and LU MBT*. In: *Pulmonary tuberculosis. Guidelines for physicians*. Ed by AE Ergešov. Moscow: Galleya-Print; 2017. P. 213–224. (In Russ).]
22. World Health Organization. WHO/HTM/TB/2013.01 *The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: expert group meeting report* [Internet]. Geneva: WHO; 2013 [accessed 2019 May 18]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78099>.
23. World Health Organization. *WHO policy statement: molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis* [Internet]. Geneva: WHO; 2008 [accessed 2019 May 18]. Available from: https://www.who.int/tb/laboratory/line_probe_assays/en/.
24. Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, et al. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7):2531–2540. doi: 10.1128/JCM.39.7.2531-2540.2001.
25. Васильева И.А., Черноусова Л.Н., Заседателев А.С., и др. Клиническое значение микрочиповой технологии определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза // *Проблемы туберкулеза*. — 2002. — Т.79. — №6. — С. 21–24. [Vasil'yeva IA, Chernousova LN, Zasedatelev AS, et al. Klinicheskoye znachenie mikrochipovoi tekhnologii opredeleniya lekarstvennoy ustoichivosti mikobakterii tuberkuleza. *Problemy tuberkuleza*. 2002;79(6):21–24. (In Russ).]
26. Антонова О.В., Грядун Д.А., Лапа С.А., и др. Выявление мутаций в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, приводящих к устойчивости к фторхинолонам, методом гибридизации на биологических микрочипах // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2008. — Т.145. — №1. — С. 115–120. [Antonova OV, Gryadunov DA, Lapa SA, et al. Detection of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genome determining resistance to fluoroquinolones by hybridization on biological microchips. *Bull Exp Biol Med*. 2008;145(1):108–113. (In Russ).]
27. Вахрушева Д.В., Еремеева Н.И., Умпелева Т.В., Белоусова К.В. Опыт применения технологии «ТБ-ТЕСТ» (БИОЧИП-ИМБ, Россия) в диагностическом алгоритме // *Туберкулез и болезни легких*. — 2017. — Т.95. — №10. — С. 29–35. [Vakhrusheva DV, Eremeeva NI, Umpeleva TV, Belousova K.V. Experience of using TB-TEST technology (BIOCHIP-IMB, Russia) within the diagnostic procedure. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2017;95(10):29–35. (In Russ).] doi: 10.21292/2075-1230-2017-95-10-29-35.
28. World Health Organization. WHO/HTM/TB/2013.16 *Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children*. Geneva: WHO; 2013.
29. Kurbatova EV, Kaminski DA, Erokhin VV, et al. Performance of Cepheid Xpert MTB/RIF and TB-Biochip MDR in two regions of Russia with a high prevalence of drug-resistant tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(6):735–743. doi: 10.1007/s10096-012-1798-0.
30. Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., и др. Сравнение картриджной технологии Xpert MTB/RIF с микробиологическими методами выявления микобактерий туберкулеза и определения лекарственной чувствительности // *Туберкулез и социально-значимые заболевания*. — 2013. — №2. — С. 25–29. [Andreevskaya SN, Smirnova TG, Larionova EE, et al. Comparison of Xpert MBT/RIF cartridge technology with microbiological methods for MBT detection and drug susceptibility testing. *Tuberkulez i sotsial'no znachimye zabolevaniya*. 2013;(2):25–29. (In Russ).]
31. World Health Organization. WHO/HTM/TB/2017.04 *WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF* [Internet]. Geneva: WHO; 2017 [accessed 2019 May 18]. Available from: <https://www.who.int/tb/publications/2017/XpertUltra/en/>.
32. Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Андриевская И.Ю., и др. Сравнительный анализ фенотипической и генотипической лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от детей и подростков из стационара ЦНИИТ за период 2011–2018 гг. // *Вестник ЦНИИТ*. — 2018. — №3. — С. 30–41. [Andreevskaya SN, Smirnova TG, Andrievskaya IYu, et al. The comparative analysis of phenotypic and genotypic drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from children and adolescent at the hospital of the central TB research institute in 2011–2018. *CTRI Bulletin*. 2018;(3):30–41. (In Russ).] doi: 10.7868/S2587667818030056.
33. Черноусова Л.Н., Ларионова Е.Е., Смирнова Т.Г., и др. Фенотипическая чувствительность к противотуберкулезным препаратам штаммов *M. tuberculosis* с мутациями, ассоциированными с устойчивостью к рифампицину и изониазиду // *Вестник ЦНИИТ*. — 2017. — №1. — С. 10–18. [Chernousova LN, Larionova EE, Smirnova TG, et al. Phenotypic susceptibility to TB drugs in *M. tuberculosis* strains with mutations associated with rifampicin and isoniazid-resistance. *CTRI Bulletin*. 2017;(1):10–18. (In Russ).] doi: 10.7868/S2587667817010010.
34. Nikam C, Kazi M, Nair C, et al. Evaluation of the Indian TrueNAT micro RT-PCR device with GeneXpert for case detection of pulmonary tuberculosis. *Int J Mycobacteriol*. 2014;3(3):205–210. doi: 10.1016/j.ijmyco.2014.04.003.
35. Castan P, de Pablo A, Fernández-Romero N, et al. Point-of-care system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance in sputum samples. *J Clin Microbiol*. 2014;52(2):502–507. doi: 10.1128/JCM.02209-13.
36. Cabibbe AM, Miotto P, Moure R, et al. A lab-on-chip based platform for fast molecular diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3876–3880. doi: 10.1128/JCM.01824-15.
37. Lazzeri E, Santoro F, Oggioni MR, et al. Novel primer-probe sets for detection and identification of mycobacteria by PCR-microarray assay. *J Clin Microbiol*. 2012;50(11):3777–3779. doi: 10.1128/JCM.02300-12.
38. Патент РФ на изобретение RU № 2574917. Варламов Д.А., Сочивко Д.Г., Аляпкина Ю.С., и др. *Реагент, позволяющий инактивировать микроорганизмы, экстрагировать и сохранять ДНК бактерий в форме, пригодной для высокоэффективной молекулярной диагностики*. [Patent RUS № 2574917. Varlamov DA, Sochivko DG, Alyapkina YuS, et al. *Reagent, pozvoliaushchii inaktivirovat' mikroorganizmy, ekstragirovat' i sokhraniat' DNK bakterii v forme, prigodnoi dlia vysokoeffektivnoi molekuliarnoi diagnostiki*. (In Russ).] Доступно по: <http://www.freepatent.ru/patents/2574917>. Ссылка активна на 18.05.2019.
39. Hofmann-Thiel S, Molodtsov N, Antonenka U, Hoffmann H. Evaluation of the Abbott RealTime MTB and RealTime MTB

- INH/RIF assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and resistance markers in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):3022–3027. doi: 10.1128/JCM.01144-16.
40. Park KS, Kim JY, Lee JW, et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF and Cobas TaqMan MTB assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 2013;51(10):3225–3227. doi: 10.1128/JCM.01335-13.
41. Zimmermann S, Dalpke A, Murray P, et al. *Pre-validation of the BD Max MDR-TB assay for the rapid detection of MTBc DNA and mutations associated with rifampin and isoniazid resistance* [Abstract]. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); 2018 Apr 21–24; Madrid, Spain; 2018 [accessed 2019 May 18]. Available from: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=61376.
42. Holmberg RC, Gindlesperger A, Stokes T, et al. Akonni TruTip and Qiagen methods for extraction of fetal circulating DNA — evaluation by real-time and digital PCR. *PLoS One.* 2013;8(8):e73068. doi: 10.1371/journal.pone.0073068.
43. Chernousova LN, Smirnova TG, Varlamov DA, et al. Automation of multi-drug resistant tuberculosis PCR diagnostics. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17(12 Suppl 2):S400.
44. Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(9):803–813. doi: 10.1111/1469-0691.12217.
45. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
46. Ashton PM, Nair S, Dallman T, et al. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nat Biotechnol.* 2015;33(3):296–300. doi: 10.1038/nbt.3103.
47. Sims D, Sudbery I, Illott NE, et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2014;15(2):121–132. doi: 10.1038/nrg3642.
48. Flandrois JP, Lina G, Dumitrescu O. MUBII-TB-DB: a database of mutations associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Bioinformatics.* 2014;15:107. doi: 10.1186/1471-2105-15-107.
49. Gardy JL. Towards genomic prediction of drug resistance in tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(10):1124–1125. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00088-2.
50. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, et al. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med.* 2009;6(2):e2. doi: 10.1371/journal.pmed.1000002.
51. Prasanna A, Niranjana V. Classification of *Mycobacterium tuberculosis* DR, MDR, XDR isolates and identification of signature mutation pattern of drug resistance. *Bioinformation.* 2019;15(4):261–268. doi: 10.6026/97320630015261.
52. Coll F, McNeerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med.* 2015;7(1):51. doi: 10.1186/s13073-015-0164-0.
53. Bradley P, Gordon NC, Walker TM, et al. Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun.* 2015;6:10063. doi: 10.1038/ncomms10063.
54. Pankhurst LJ, Del Ojo Elias C, Votintseva AA, et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. *Lancet Respir Med.* 2016;4(1):49–58. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00466-X.
55. Dippenaar A, Warren RM. Fighting an old disease with next-generation sequencing. *Elife.* 2015;4:e06782. doi: 10.7554/eLife.06782.
56. Lyon E, Cockerill FR, Bale SJ, et al. Next-generation sequencing in clinical diagnostics: experiences of early adopters. *Clin Chem.* 2015;61(1):41–49. doi: 10.1373/clinchem.2014.222687.
57. Walker TM, Kohl TA, Omar SV, et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(10):1193–1202. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00062-6.
58. Schito M, Dolinger DL. A collaborative approach for “ReSeq-ing” *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance: convergence for drug and diagnostic developers. *EBioMedicine.* 2015;2(10):1262–1265. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.10.008.
59. ВОЗ. Европейское региональное бюро. *Алгоритм лабораторной диагностики и мониторинга лечения туберкулеза легких и туберкулеза с лекарственной устойчивостью на основе применения современных быстрых молекулярных методов* [интернет]. WHO: Regional Office for Europe; 2017. [WHO. Regional Office for Europe. *Algorithm for laboratory diagnosis and treatment-monitoring of pulmonary tuberculosis and drug-resistant tuberculosis using state-of-the-art rapid molecular diagnostic technologies* [Internet]. WHO: Regional Office for Europe; 2017. (In Russ).] Доступно по: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/336118/ELI-TB-Laboratory_diag_algorithm_RUS.pdf?ua=1. Ссылка активна на 18.05.2019.
60. Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Смирнова Т.Г., и др. Оценка результатов выявления микобактерий, полученных различными методами исследования // *Медицинский альянс*. — 2018. — №3. — С. 25–30. [Sevastyanova EV, Larionova EE, Smirnova TG, et al. Evaluation of the results of *Mycobacterium tuberculosis* detection, obtained by different studies methods. *Medical alliance.* 2018;(3):25–30. (In Russ).]
61. Васильева И.А., Аксенова В.А., Эргешов А.Э., и др. *Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания*. — М.: Триада, 2014. — 55 с. [Vasil'yeva IA, Aksenova VA, Ergeshov AE, et al. *Federal'nyye klinicheskiye rekomendatsii po diagnostike i lecheniiu tuberkuleza organov dykhaniia*. Moscow: Triada; 2014. 55 p. (In Russ).]
62. Васильева И.А., Аксенова В.А., Эргешов А.Э., и др. *Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя*. — М.: Триада, 2014. — 71 с. [Vasil'yeva IA, Aksenova VA, Ergeshov AE, et al. *Federal'nyye klinicheskiye rekomendatsii po diagnostike i lecheniiu tuberkuleza organov dykhaniia mnozhestvennoi i shirokoi lekarstvennoi ustoichivost'i u vzbuditelia*. Moscow: Triada; 2014. 71 p. (In Russ).]
63. Ergeshov A, Andreevskaya S, Smirnova T, et al. The dynamics of *M. tuberculosis* drug resistance isolated from pulmonary TB patients at the Central TB Research Institute, Moscow, 2012–2017. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2018;2(11 Suppl. 2):S208.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Эргешов Атаджан Эргешович, д.м.н., профессор [Atadzhan E. Ergeshov, MD, PhD, Professor];
адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2 [address: 2, Yauzskaya Alley, 107564, Moscow, Russia],
тел.: +7 (499) 785-90-19, **e-mail:** cniit@ctri.ru, **SPIN-код:** 8372-1666, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2494-9275>

Черноусова Лариса Николаевна, д.б.н., профессор [Larisa N. Chernousova, Doctor of Biological Sciences, Professor];
e-mail: lchernousova@mail.ru, **SPIN-код:** 2267-8867, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6288-7549>

Андреевская Софья Николаевна, к.м.н. [Sofya N. Andreevskaya, MD, PhD]; **e-mail:** andsofia@mail.ru,
SPIN-код: 4775-1459, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2997-942X>